

29 NOV 2004

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年12月4日 (04.12.2003)

PCT

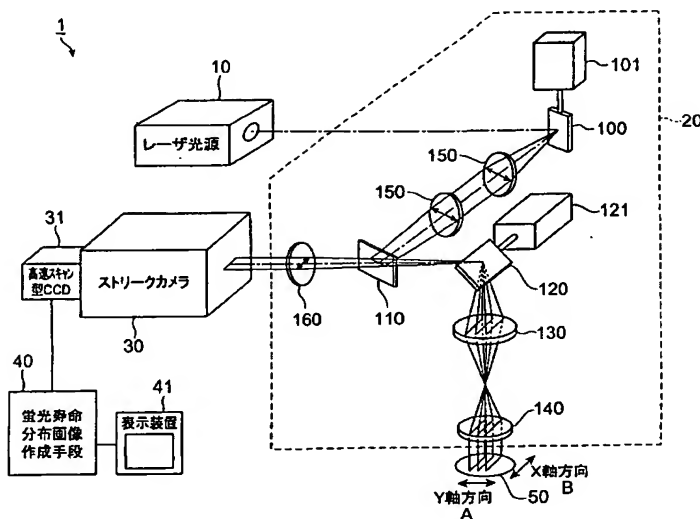
(10) 国際公開番号
WO 03/100399 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 21/64 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/06702 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 晴久
(22) 国際出願日: 2003年5月28日 (28.05.2003) (SAITOH, Haruhisa) [JP/JP]; 〒435-8558 静岡県 浜松市 市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内
(25) 国際出願の言語: 日本語 Shizuoka (JP). 寺田 浩敏 (TERADA, Hirotoshi) [JP/JP]; 〒435-8558 静岡県 浜松市 市野町1126番地の1 浜松
(26) 国際公開の言語: 日本語 ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP).
(30) 優先権データ: 特願2002-156276 2002年5月29日 (29.05.2002) JP (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都 中央区 銀座一丁目10番6号 銀座
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 浜松ホトニクス株式会社 (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) [JP/JP]; 〒435-8558 静岡県 浜松市 市野町1126番地の1 Shizuoka (JP). ファーストビル 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: FLUORESCENCE LIFETIME DISTRIBUTION IMAGE MEASURING SYSTEM AND ITS MEASURING METHOD

(54) 発明の名称: 蛍光寿命分布画像測定装置およびその測定方法



10...LASER LIGHT SOURCE
30...STREAK CAMERA
31...HIGH-SPEED SCANNING CCD
40...FLUORESCENCE LIFETIME DISTRIBUTION IMAGE FORMING MEANS
41...DISPLAY
A...Y-AXIS DIRECTION
B...X-AXIS DIRECTION

(57) Abstract: A pulse exciting light emitted from a laser light source (10) is allowed to scan in a first direction by a first scanning means (100), and then scan in a second direction perpendicular to the first direction by a second scanning means (120) before being condensed by an objective optical system (140) in order to irradiate a sample (50). Fluorescence emitted from the sample (50) is passed through the objective optical system (140) to the second scanning means (120) and runs in the second direction perpendicular to the first direction to be output to an optical isolating means (110) thence passed to a streak camera (30) where it is recorded as a time variation of fluorescence intensity. Fluorescence lifetime is calculated based on the time variation of fluorescence intensity and a fluorescence lifetime distribution image is formed.

(57) 要約: レーザ光源 10 より発せられたパルス励起光は、第1走査手段 100 により第1方向に走査され、第2走査手段 120 により第1方向に垂直な第2方向に走査され、対物光学系 140 により集光されて試料 50 に照射される。試料 50 から放出される蛍光は、対物光学系 140 により第2走査手段 120 へ出力され、第2走査手段 120 により第1方向に垂直な第2方向に走査して光分離手段 110 へ出力され、光分離手段 110 からストリークカメラ 30 へ出力され、ストリークカメラ 30 により蛍光強度の時

間変化として記録される。この蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

蛍光寿命分布画像測定装置およびその測定方法

技術分野

本発明は、励起光を照射された試料から放出される蛍光の蛍光寿命の分布画像
5 を取得する蛍光寿命分布画像測定装置およびその方法に関するものである。

背景技術

被測定物に励起光を照射すると、その被測定物に含まれる蛍光物質から蛍光が
発生する。その蛍光の強度は、励起光照射時刻から時間を経るに従って指数関数
的に減衰していく。この蛍光減衰曲線の減衰特性を表すのが蛍光寿命であり、こ
10 の蛍光寿命は、蛍光物質の種類によって決まっている。

近年、蛍光タンパク質や蛍光色素で染色した細胞の蛍光寿命値の分布を画像化
することにより、細胞内における反応を高精度に測定することができるFLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) と呼ばれる測定方法が提案され、論文「Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM): Instrumentation and
15 Applications」(Critical Reviews in Analytical Chemistry, 23(5) : 369-395 (1992)) に記載されている。本測定方法は、例えば、細胞内で遺伝子が発現したかどうかを調べる蛍光タンパク質、カルシウムなどのイオン濃度を測定できる蛍光色素、細胞内での pH を測定できる蛍光色素などの蛍光寿命の変化を測定することにより、遺伝子発現の有無、イオン濃度、pH などの細胞内での分布を画像化す
20 ることができるものである。

このようなFLIM測定法として、PMTによる時間相関計数法とレーザスキャンとの
組み合わせによる方法、ゲート・イメージ・インテンシファイアによる時間分解
画像計測法、及び、ストリークカメラによる方法が知られている。

発明の開示

しかしながら上記従来例では以下のような問題点がある。PMT による時間相関
25 計数法を用いた方法は、励起光の1パルス毎に単一光子しか測定できないので、

測定時間が長くかかりすぎるため時々刻々と変化する細胞内の反応を追跡することができないという問題がある。

ゲート・イメージ・インテンシファイアを用いた方法は、ゲート法により蛍光寿命を測定することから、蛍光の取得効率が悪く、励起レーザの影響で細胞等の生体試料の退色及び試料自体の損傷が発生するという問題点がある。

一方、ストリークカメラを用いた従来の方法は、時間分解能および感度が高いものの、励起レーザの影響で細胞等の生体試料の退色及び試料自体の損傷が発生するという問題点がある。

本発明は、上記問題点を解消する為になされたものであり、細胞等の試料へのダメージを最小にするとともに、短時間での測定を実現することができる蛍光寿命分布画像測定装置およびその測定方法を提供することを目的とする。

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、パルス励起光を試料に照射し、試料から放出される蛍光の寿命の試料における分布を測定する蛍光寿命分布画像測定装置であって、パルス励起光を発するレーザ光源と、レーザ光源の発したパルス励起光を試料に導いて照射し、試料から放出される蛍光を導いて出力する測定用光学系と、測定用光学系から出力され到達した蛍光の蛍光強度の時間変化を記録するストリークカメラと、ストリークカメラで記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する蛍光寿命分布画像作成手段と、を備え、測定用光学系は、第1走査手段、光分離手段、第2走査手段、及び、対物光学系を備え、第1走査手段は、レーザ光源の発したパルス励起光を第1方向に走査し、光分離手段は、第1走査手段から到達したパルス励起光を第2走査手段へ導き、第2走査手段から到達した蛍光をストリークカメラに導き、第2走査手段は、光分離手段から到達したパルス励起光を第1方向に垂直な第2方向に走査し、対物光学系から出力され到達した蛍光を第1方向に垂直な第2方向に走査して光分離手段へ導く。対物光学系は、第1走査手段、第2走査手段と共役な位置関係にあり、第1方向及び第2方向、それぞれに走査されたパルス励

起光を集光して試料の各走査点に照射し、パルス励起光が照射されたときに各走査点から放出される蛍光を第2走査手段へ出力すること、を特徴とする。

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置によれば、レーザ光源より発せられたパルス励起光は、測定用光学系に出力され、測定用光学系に出力されたパルス励起光は、第1走査手段により第1方向に走査されて出力され、第1方向に走査されて出力されたパルス励起光は、第2走査手段により第1方向に垂直な第2方向に走査して出力され、第2方向に走査して出力されたパルス励起光は、対物光学系により集光されて試料に照射される。パルス励起光が試料に照射されたときに試料から放出される蛍光は、対物光学系により第2走査手段へ出力され、第2走査手段へ出力された蛍光は、第2走査手段により第1方向に垂直な第2方向に走査して光分離手段へ出力される。ここで、パルス励起光と蛍光とが第2走査手段を往復通過する事で、蛍光は、ストリークカメラ上で第2走査方向には走査されず第1走査方向にのみ走査される。光分離手段へ出力された蛍光は、光分離手段によりストリークカメラへ出力され、ストリークカメラへ出力された蛍光は、ストリークカメラにより蛍光の蛍光強度の時間変化として記録される。そして、ストリークカメラで記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、対物光学系が試料の内部に集光点を合わせる位置に配置され、パルス励起光のパルス幅が 150 fs 以下、パルス励起光の集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を λ としたときにパルス励起光の波長が λ 以上 2λ 以下であることが好ましい。このようにすれば、パルス励起光により集光点において二光子励起を起こすことができる。

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、パルス励起光の波長が 750 nm 以上 1000 nm 以下であるのが好ましい。このようにすれば、蛍光タンパク質や蛍光色素で染色した細胞等の試料において二光子励起を起こすことができる。

本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、対物光学系の配置が第1方向及び第2方向の双方に垂直な方向に沿って移動するのが好ましい。このようにすれば、試料の深さ方向に対しても蛍光寿命を測定することができるため、3次元的な蛍光寿命分布画像を得る事ができる。

- 5 本発明に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、第1走査手段及び第2走査手段それぞれがガルバノミラーであり、光分離手段がダイクロイックミラーであるのが好ましい。

10 本発明に係る蛍光寿命分布画像測定方法は、パルス励起光を試料に照射し、試料から放出される蛍光の寿命の前記試料における分布を測定する蛍光寿命分布画像測定方法であって、パルス幅が 150 fs 以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を λ としたときに波長が λ 以上 2λ 以下であるパルス励起光を発する第1ステップと、パルス励起光を第1方向に走査する第2ステップと、第1方向に走査されたパルス励起光を第1方向に垂直な第2方向に走査する第3ステップと、第1方向及び第2方向、それぞれに走査されたパルス励起光を試料の内部の各走査点に集光させる第4ステップと、集光されたパルス励起光の照射により各走査点から放出される蛍光の蛍光強度の時間変化を記録する第5ステップと、記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する第6ステップと、を備えることを特徴とする。

20 本発明に係る蛍光寿命分布画像測定方法によれば、第1ステップで発せられたパルス幅が 150 fs 以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を λ としたときに波長が λ 以上 2λ 以下であるパルス励起光は、第2ステップで第1方向に走査される。第1方向に走査されたパルス励起光は、第3ステップで第1方向に垂直な第2方向に走査される。第1方向及び第2方向、それぞれに走査されたパルス励起光は第4ステップで試料の内部に集光され、集光されたパルス励起光の照射

25

により放出される蛍光の蛍光強度の時間変化が第5ステップで記録される。記録された蛍光強度の時間変化に基づいて第6ステップで蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

図面の簡単な説明

- 5 図1は、本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置の構成図である。
- 図2は、本実施形態に係る顕微鏡下における試料のスキャン状態を示す図である。
- 図3は、本実施形態に係るストリークカメラにより記録された蛍光のストリーク像を高速スキャン型CCDで撮像した画像を示す図である。
- 10 図4は、各走査点における蛍光強度の時間変化を示す図である。
- 図5は、蛍光寿命プロファイルを示す図である。
- 図6Aは、パルス励起光が発せられるタイミングを示す図である。
- 図6Bは、ストリークカメラが検出する蛍光強度の時間変化を示す図である。
- 図6Cは、ストリークカメラにおいて印加される掃引電圧の時間変化を示す図
- 15 である。
- 図6Dは、X軸方向に走査されるタイミングを示す図である。
- 図6Eは、CCDが画像を撮像するタイミングを示す図である。
- 図6Fは、Y軸方向に走査されるタイミングを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 20 以下、添付図面を参照して本発明の実施の形態を詳細に説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置は、二光子励起により試料を励起させている。二光子励起はレーザ光の強度を非常に大きくした場合に発生する現象である。まず、二光子励起について簡単に説明する。

- 25 試料50の吸収のバンドギャップ E_g よりも光子のエネルギー $h\nu$ が小さいと試料を励起することが出来ない。よって、試料50に吸収が生じる条件は $h\nu >$

E_g である。しかし、パルス励起光の強度を非常に大きくすると $n h \nu > E_g$ の条件 ($n = 2, 3, 4, \dots$ である) で試料 50 が励起される。この現象を多光子励起とい、 $n = 2$ の場合を二光子励起という。パルス波の場合、レーザ光の強度はレーザ光の集光点のピークパワー密度 (W/cm^2) で決まり、例えばピークパワー密度が $1 \times 10^5 (W/cm^2)$ 以上の条件で多光子吸収が生じる。ピークパワー密度は、(集光点におけるレーザ光の 1 パルス当たりのエネルギー) \div (レーザ光のビームスポット断面積 \times パルス幅) により求められる。

二光子励起は、一光子励起のときよりも、エネルギーが低い長波長のレーザを使用することができる。長波長のレーザを使用できることの長所としては、細胞などの試料のダメージが小さいことと、組織内の深部までレーザが届くため、試料の比較的深い領域も観察できることが挙げられる。また、二光子励起は、二個の光子がほぼ同時に来た場合に起こるため、光強度のほぼ 2 乗に比例して発生すると言われ、レーザの集光点だけで蛍光分子が励起される。したがって、集光点ではない観察しない部分の蛍光退色を防ぐことができ、長時間の観察や組織等の試料の広い範囲で観察することも可能となる。なお、集光点とはレーザ光が集光した箇所のことである。

上記の理由から細胞等の生体試料の蛍光寿命を測定するには、二光子励起が必須である。そのため発明者は、ストリークカメラを用いたスリット光蛍光寿命分布画像計測装置を試作し、スリット光により二光子励起を起こす方法を試みた。しかし、スリット光では、二光子励起の励起効率の低さから蛍光寿命データの取得に至らなかった。そこで、発明者は、さらに開発に努め本願発明を完成するに至った。

図 1 は本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置 1 の概略構成を示す構成図である。

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置 1 は、蛍光分子を含む試料 50 にパルス励起光を照射し、この試料 50 から放出される蛍光の寿命を測定するもの

である。この蛍光寿命分布画像測定装置 1 は、レーザ光源 10、測定用光学系 20、ストリークカメラ 30、及び、蛍光寿命分布画像作成手段 40 を備えている。

レーザ光源 10 は、試料 50 に対して照射すべきパルス励起光を繰り返し出力するものであり、例えば、チタンサファイアレーザ等の超短光パルス（フェムト秒パルス）レーザ光源が好適に用いられる。

レーザ光源 10 の側方に設けられる測定用光学系 20 は、レーザ光源 10 の発したパルス励起光を試料 50 に導いて照射し、試料 50 から放出される蛍光を導いてストリークカメラへ出力するものであり、第 1 走査手段 100、光分離手段 110、第 2 走査手段 120、励起光光学系 130、対物光学系 140、瞳リレー光学系 150、及び、結像光学系 160 を有している。

レーザ光源 10 の側方に設けられる第 1 走査手段 100 は、第 1 スキャナドライバ 101 により駆動され、レーザ光源 10 より発せられたパルス励起光を第 1 方向（X 軸方向）に走査して瞳リレー光学系 150 へ出力するものであり、例えば、ガルバノミラー等が好適に用いられる。

第 1 走査手段 100 の側方に設けられる瞳リレー光学系 150 は、第 1 走査手段 100 と第 2 走査手段 120 とが共役の関係になるように配置され、第 1 走査手段 100 から到達したパルス励起光を光分離手段 110 を介して第 2 走査手段 120 へ導くものである。

瞳リレー光学系 150 の側方に設けられる光分離手段 110 は、瞳リレー光学系 150 から到達したパルス励起光を反射して第 2 走査手段 120 へ出力し、第 2 走査手段 120 から到達した蛍光を透過して結像光学系 160 へ出力するものであり、例えば、ダイクロイックミラー等が好適に用いられる。

光分離手段 110 の側方に設けられている第 2 走査手段 120 は、第 2 スキャナドライバ 121 により駆動され、光分離手段 110 から到達したパルス励起光を第 1 方向（以下「X 軸方向」という）に垂直な第 2 方向（以下「Y 軸方向」と

いう) に走査して励起光光学系 130 へ出力し、励起光光学系 130 から到達した蛍光を X 軸方向に垂直な Y 軸方向に走査して光分離手段 110 へ出力するものであり、例えば、ガルバノミラー等が好適に用いられる。

第 2 走査手段 120 の下方に位置する励起光光学系 130 は、第 2 走査手段 120 と対物光学系 140 とが共役の関係になるように配置され、第 2 走査手段 120 から到達したパルス励起光を対物光学系 140 へ出力し、対物光学系 140 から到達した蛍光を第 2 走査手段 120 へ出力するものである。

励起光光学系 130 の下方に位置する対物光学系 140 は、励起光光学系 130 から到達したパルス励起光を集光して試料 50 に照射し、パルス励起光が試料 50 に照射されたときに試料 50 から放出される蛍光を励起光光学系 130 へ出力するものである。

光分離手段 110 の側方に設けられている結像光学系 160 は、試料 50 とストリークカメラ 30 の光電面とが共役の関係になるように配置され、光分離手段 110 から到達した蛍光をストリークカメラ 30 の光電面上に結像するものである。

結像光学系 160 の側方に設けられているストリークカメラ 30 は、測定用光学系 20 から出力された蛍光の蛍光強度の時間変化を記録するものであり、高速スキャン型 CCD 31 は、ストリークカメラ 30 の蛍光面上の光像を撮像するものである。

蛍光寿命分布画像作成手段 40 は、ストリークカメラ 30 で記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成するものである。

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置 1 の動作について説明するとともに、蛍光寿命分布測定方法についても説明する。

本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置 1 によれば、レーザ光源 10 より発せられたパルス励起光は、測定用光学系 20 に出力され、測定用光学系 20 に

出力されたパルス励起光は、第1走査手段100によりX軸方向に走査されて出力され、X軸方向に走査されて出力されたパルス励起光は、瞳リレー光学系150により光分離手段110へ出力され、光分離手段110へ出力されたパルス励起光は、第2走査手段120によりX軸方向に垂直なY軸方向に走査して出力され、Y軸方向に走査して出力されたパルス励起光は、対物光学系140により集光されて試料50に照射される。パルス励起光が試料50に照射されたときに試料50から放出される蛍光は、対物光学系140により励起光光学系130へ出力され、励起光光学系130へ出力された蛍光は、励起光光学系130により第2走査手段120へ出力され、第2走査手段120へ出力された蛍光は、第2走査手段120によりX軸方向に垂直なY軸方向に走査して光分離手段110へ出力され、光分離手段110へ出力された蛍光は、光分離手段110により結像光学系160へ出力され、結像光学系160へ出力された蛍光は、結像光学系160によりストリークカメラ30へ出力され、ストリークカメラ30へ出力された蛍光は、ストリークカメラ30により蛍光の蛍光強度の時間変化として記録される。そして、ストリークカメラ30で記録された蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

また、本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定方法によれば、第1ステップで発せられたパルス幅が 150 fs 以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料50が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を λ としたときに波長が λ 以上 2λ 以下であるパルス励起光は、第2ステップでX軸方向に走査される。X軸方向に走査されたパルス励起光は、第3ステップでX軸方向に垂直なY軸方向に走査される。X軸方向及びY軸方向、それぞれに走査されたパルス励起光は第4ステップで試料の内部に集光され、集光されたパルス励起光の照射により放出される蛍光の蛍光強度の時間変化が第5ステップで記録される。記録された蛍光強度の時間変化に基づいて第6ステップで蛍光寿命が算出され、蛍光寿命分布画像が作成される。

図2は、顕微鏡の対物光学系140下における細胞等の試料50に対する走査状態を示す。本図は、スポット状のパルス励起光を、試料50のX軸方向に高速に走査（1、2、3、・・・、M）しながら、さらにY軸方向にも走査（1、2、3、・・・、N）したものを模式的に示したものである。X軸方向の走査距離は、
5 ストリークカメラ30の光電面のスリット長に対応している。また、X軸方向の走査周期は100Hz～1kHzに設定されている。

パルス励起光の周波数は約1MHz～80MHzであり、X軸走査手段20は100Hz～1kHzで走査するため、パルス励起光が集光された直径約0.5μmの光球がX軸方向に走査されることにより擬似スリット状に並ぶ。

10 ここで、Y軸方向の走査では、第2走査手段120（ガルバノミラー）が、光分離手段110（ダイクロイックミラー）より後方に配置され、第2走査手段120（ガルバノミラー）は、励起光光学系130（瞳投影レンズ）の後側焦点面に位置し、Y軸方向にのみパルス励起光を走査する。試料から発生する蛍光はこの第2走査手段を通過しディスキャンされストリークカメラ30へ向かう。すな
15 わち、励起光光学系130（瞳投影レンズ）上のY軸方向に振られた像は、X軸方向にのみ走査された形となり、必ずストリークカメラ30の光電面に結像する事になる。

20 蛍光は、ストリークカメラ30のスリットを介して結像光学系160により、ストリーク管の光電面上にスリット像として結像される。蛍光がスリットに入射し、光電面に達したとすると、この蛍光は、光電面によりその光の強度に応じた数の電子に変換され、加速電極により加速されて蛍光面に向かって飛び出して行く。この電子が掃引電極の間を通過する時、タイミングを合わせて掃引電極に印加された高電圧により、高速掃引が行われる。これにより、少しずつ遅れてやってきた電子群は垂直方向の少しずつ異なった角度に偏向され、MCP（マイクロチャネルプレート）に飛び込む。電子群はMCPを通過する際、数万倍まで電子の数を増
25 倍された後、蛍光面に衝突し、光に変換される。蛍光面では、最も早く入射した

光パルスに対応する蛍光像が最も上方に位置し、順に下方へと配列される。つまり、蛍光面上の垂直方向が時間軸になる。また、蛍光像の明るさは、それぞれの蛍光の強度に比例している。さらに、蛍光像の水平方向の位置は、蛍光の水平方向の位置に対応している。蛍光面上の増幅されたストリーク像は、高速スキャン型CCD31により撮像される。ここで、高速スキャン型CCD31は、ストリーク掃引回路からのCCDトリガ信号を受信したCCDカメラ駆動回路からの指令信号により露光を開始する。

図6A-Fは本実施形態に係る蛍光寿命分布画像測定装置1の動作タイミングを示す図である。ここで、レーザ光源10の発するパルス励起光の周期とストリークカメラ30の掃引周期とは同期している。従って、パルス励起光の照射によって試料50から放出された蛍光ごとにストリーク像が取得され、高速スキャン型CCD31により撮像される。

また、図6A-Fに示されるように、高速スキャン型CCD31の露光時間とY軸の掃引タイミングとは同期している。高速スキャン型CCD31の露光時間は約200msであり、この間第2走査手段120は停止している。約200ms経過し、CCD画像1枚分の撮像が終了すると、第2走査手段120（ガルバノミラー）を動かし次の画像の撮像を行う。

これをN回繰り返すことによって図2に示すように、試料50に対する2次元的な走査が行われる。

図3は、本実施形態に係るストリークカメラ30により記録された蛍光のストリーク像を高速スキャン型CCD31で撮像した画像を示す図である。それぞれの画像は、高速スキャン型CCD31の露光時間の間第2走査手段120を固定しておき、高速スキャン型CCD31をその間露光させて取得したものである。X軸方向に走査（1、2、3、・・・、M）されたパルス励起光により励起され放出された蛍光の強度に対応したストリーク像が取得されている。ここで画像の水平方向がX軸方向に対応し、画像の垂直方向が時間軸となる。よって図4に示す

ように、走査点1～Mそれぞれに対応した縦のラインごとに、それぞれの走査点における蛍光強度の時間変化データが取得できる。ここで、Y軸の走査をN回行った場合には、N枚の画像が取得される。

図5は、本実施形態に係る蛍光寿命プロファイルを示す図である。蛍光の強度がピーク値の $1/e$ に減衰するまでの時間を蛍光寿命値とする。蛍光寿命分布画像作成手段40では、高速スキャン型CCD31で取得した蛍光強度の時間変化データに基づき、それぞれの縦のラインごとに、1～Mまでの各集光点に対応した試料50の蛍光寿命値を算出する。

蛍光寿命を算出するには、CCDの縦の1ラインごとに得られた蛍光強度の時間変化データに対して、時間変化を所定の曲線（関数系）等でフィッティングするフィッティング計算を行って、蛍光の蛍光寿命を算出する。この処理を1枚の画像においてMライン分行い、さらに同様の処理をN枚の画像それぞれについて行うことにより、各走査点における蛍光寿命の寿命値のデータが得られる。

以上のようにして得られた各走査点における蛍光寿命の寿命値を、寿命値の長短に応じた色彩により各走査点ごとに表示することによって、細胞等の試料50の蛍光寿命分布画像（FLIM画像）を取得することができる。

なお、蛍光寿命分布画像作成手段40には、必要に応じて、蛍光寿命分布画像作成手段40で得られた蛍光寿命分布画像を表示するための表示装置41（図1参照）を接続しておくことが好ましい。

本実施形態に係る対物光学系140は、試料50の内部に集光点を合わせる位置に配置され、パルス励起光は、パルス幅が150fs以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ 以上、及び、試料50が励起され蛍光を発し得る光の最長波長を λ としたときに波長が λ 以上 2λ 以下であるのが好適である。この場合は、パルス励起光により集光点において二光子励起を起こす事ができる。

また、パルス励起光は、波長が750nm以上1000nm以下であるのが好

適である。このようにすれば、蛍光タンパク質や蛍光色素で染色した細胞等の試料において二光子励起を起こすことができる。

本実施例において、レーザ光源 10 には、パルス幅 150 fs 以下、周波数 76 MHz のチタンサファイアレーザを使用した。また、対物光学系 140 には、
5 40 倍の油浸または水浸の対物レンズを使用した。この場合レーザの出力は約 8 mW である。また、周波数 1 MHz のレーザ光源 10 を使用した場合には、レーザ出力は、0.1 mW となる。

本実施形態に係る対物光学系 140 は、配置が X 軸方向及び Y 軸方向の双方に垂直な方向に沿って移動するのが好適である。この場合は、試料 50 の深さ方向
10 に対しても蛍光寿命を測定することができるため、3 次元の蛍光寿命分布画像を得る事ができる。

長波長レーザは、短波長のレーザより組織内の深部までレーザが届くため、試料の比較的深い領域も観察できる。また、一光子励起では集光点の前後でも励起されるため、深さ方向の空間分解能は取れないが、二光子励起は直径約 0.5 μ
15 m のパルス励起光の集光点でのみ励起が起こるので、空間分解能にすぐれる。よって、対物光学系 140 を動かして集光点を試料 80 の深さ方向に移動させることにより、深さ方向のマッピングができる。これによって、3 次元の蛍光寿命分布画像を得る事ができる。

以上、詳細に説明したとおり、本発明によれば、細胞等の試料へのダメージを
20 最小にするとともに、短時間での計測を実現することができる蛍光寿命分布画像計測装置およびその計測方法を提供することができる。

産業上の利用可能性

本発明は、例えば細胞内における遺伝子の発現及びタンパク質相互作用などを分析するのに用いられる。

請求の範囲

1. パルス励起光を試料に照射し、前記試料から放出される蛍光の寿命の前記試料における分布を測定する蛍光寿命分布画像測定装置であって、

前記パルス励起光を発するレーザ光源と、

5 前記レーザ光源の発した前記パルス励起光を前記試料に導いて照射し、前記試料から放出される前記蛍光を導いて出力する測定用光学系と、

前記測定用光学系から出力され到達した前記蛍光の蛍光強度の時間変化を記録するストリークカメラと、

10 前記ストリークカメラで記録された前記蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する蛍光寿命分布画像作成手段と、

を備え、

前記測定用光学系は、第1走査手段、光分離手段、第2走査手段、及び、対物光学系を備え、

15 前記第1走査手段は、前記レーザ光源の発した前記パルス励起光を第1方向に走査し、

前記光分離手段は、前記第1走査手段から到達した前記パルス励起光を前記第2走査手段へ導き、前記第2走査手段から到達した前記蛍光を前記ストリークカメラに導き、

20 前記第2走査手段は、前記光分離手段から到達した前記パルス励起光を前記第1方向に垂直な第2方向に走査し、前記対物光学系から出力され到達した前記蛍光を、前記パルス励起光が前記光分離手段から前記第2走査手段へ向かったのと同じ光路を前記蛍光が通るように、前記光分離手段へ導き、

25 前記対物光学系は、前記第1方向及び第2方向、それぞれに走査された前記パルス励起光を集光して前記試料の各走査点に照射し、前記パルス励起光が照射されたときに前記各走査点から放出される蛍光を前記第2走査手段へ出力すること、を特徴とする蛍光寿命分布画像測定装置。

2. 前記対物光学系は、前記試料の内部に集光点を合わせる位置に配置され、前記パルス励起光は、パルス幅が 150 fs 以下、前記集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5\text{ W/cm}^2$ 以上、及び、前記試料が励起され蛍光を発生し得る光の最長波長を λ としたときに波長が λ 以上 2λ 以下であること、

5 を特徴とする請求項 1 記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

3. 前記パルス励起光は、波長が 750 nm 以上 1000 nm 以下であること、

を特徴とする請求項 2 記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

10 4. 前記対物光学系は、配置が前記第 1 方向及び前記第 2 方向の双方に垂直な方向に沿って移動すること、

を特徴とする請求項 2 記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

5. 前記第 1 走査手段及び前記第 2 走査手段、それぞれは、ガルバノミラーであり、前記光分離手段は、ダイクロイックミラーであること、

を特徴とする請求項 1～4 のいずれか一項記載の蛍光寿命分布画像測定装置。

15 6. パルス励起光を試料に照射し、前記試料から放出される蛍光の寿命の前記試料における分布を測定する蛍光寿命分布画像測定方法であって、

パルス幅が 150 fs 以下、集光点におけるピークパワー密度が $1 \times 10^5\text{ W/cm}^2$ 以上、及び、前記試料が励起され蛍光を発生し得る光の最長波長を λ としたときに波長が λ 以上 2λ 以下である前記パルス励起光を発する第 1 ステップと、

20 前記パルス励起光を第 1 方向に走査する第 2 ステップと、

前記第 1 方向に走査された前記パルス励起光を前記第 1 方向に垂直な第 2 方向に走査する第 3 ステップと、

前記第 1 方向及び第 2 方向、それぞれに走査された前記パルス励起光を前記試料の内部の各走査点に集光させる第 4 ステップと、

25 集光された前記パルス励起光の照射により前記各走査点から放出される前記蛍光の蛍光強度の時間変化を記録する第 5 ステップと、

記録された前記蛍光強度の時間変化に基づいて蛍光寿命を算出し、蛍光寿命分布画像を作成する第6ステップと、
を備えることを特徴とする蛍光寿命分布画像測定方法。

図1

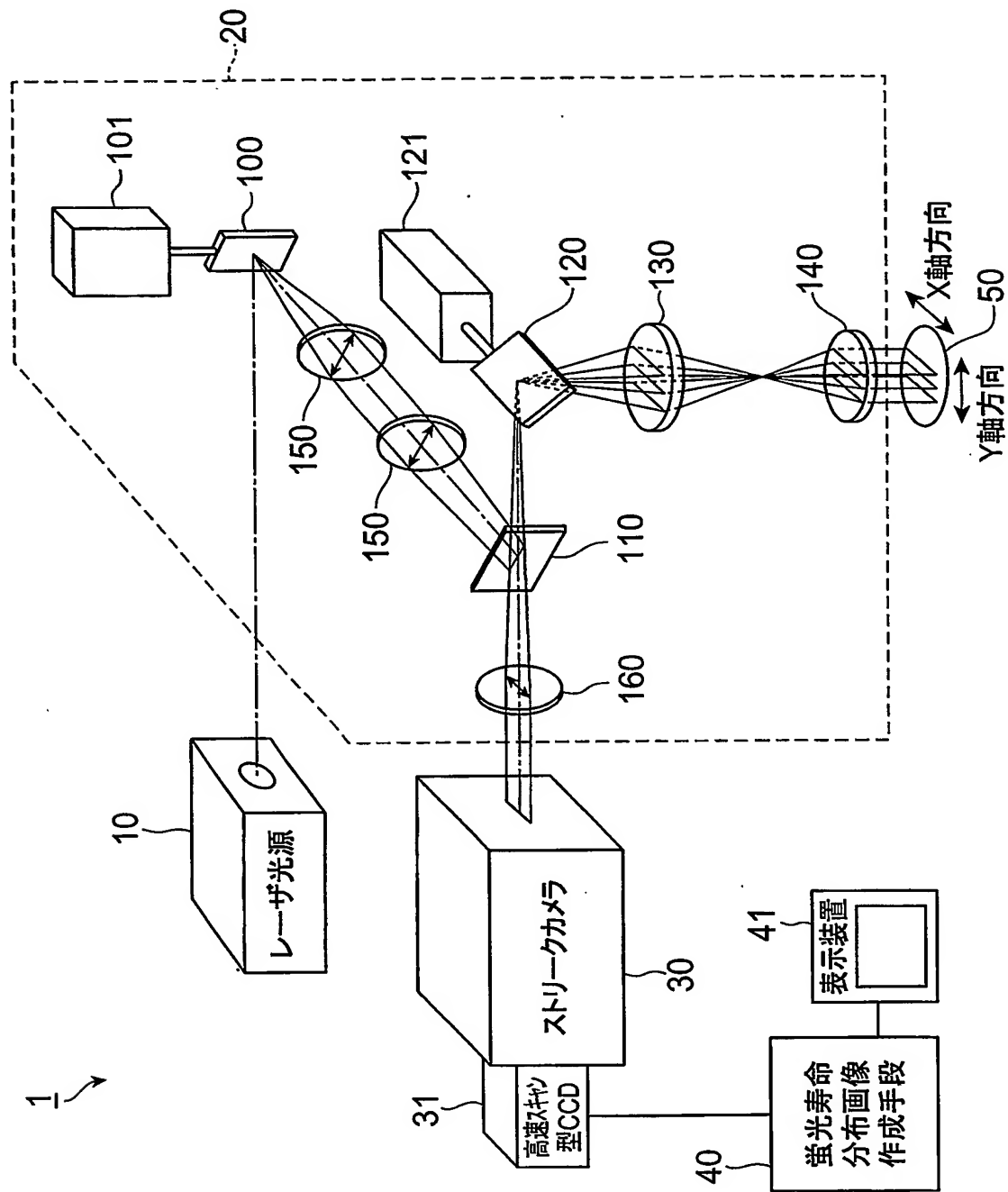


図2

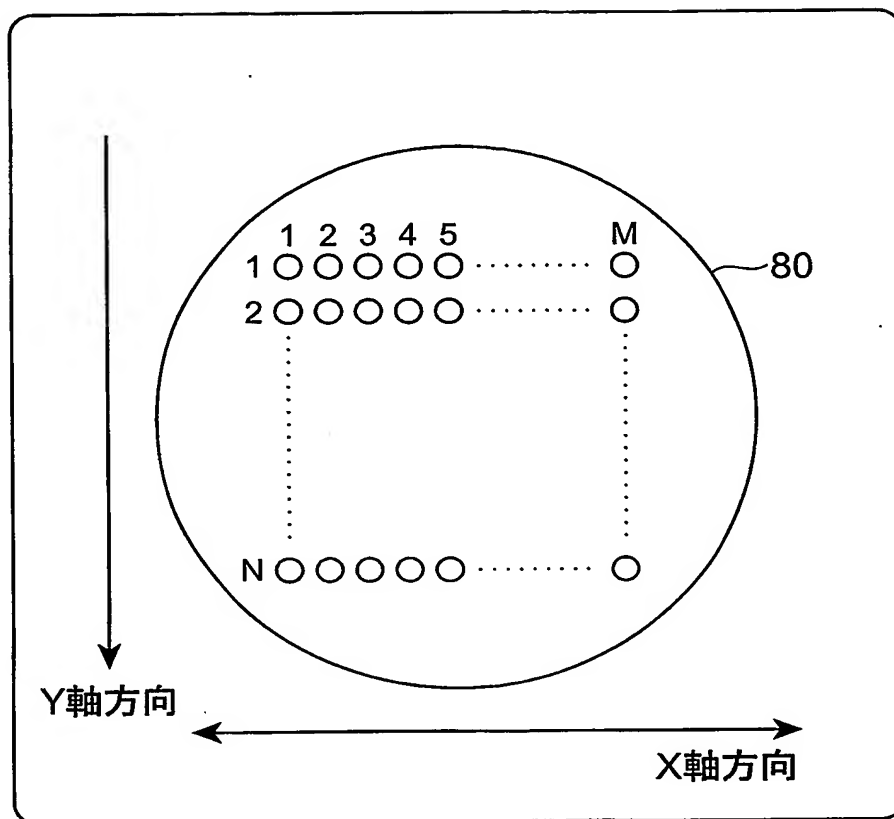


図3

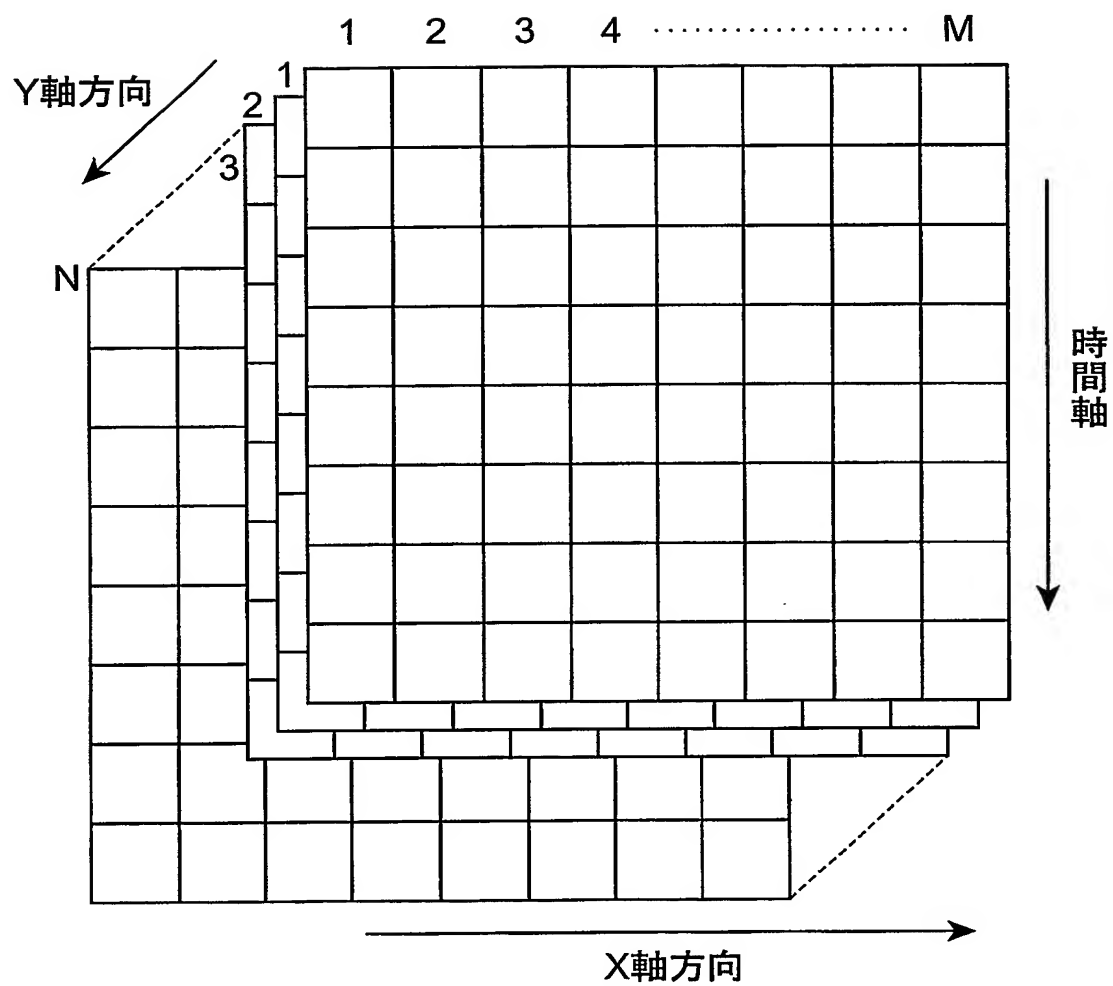


図4

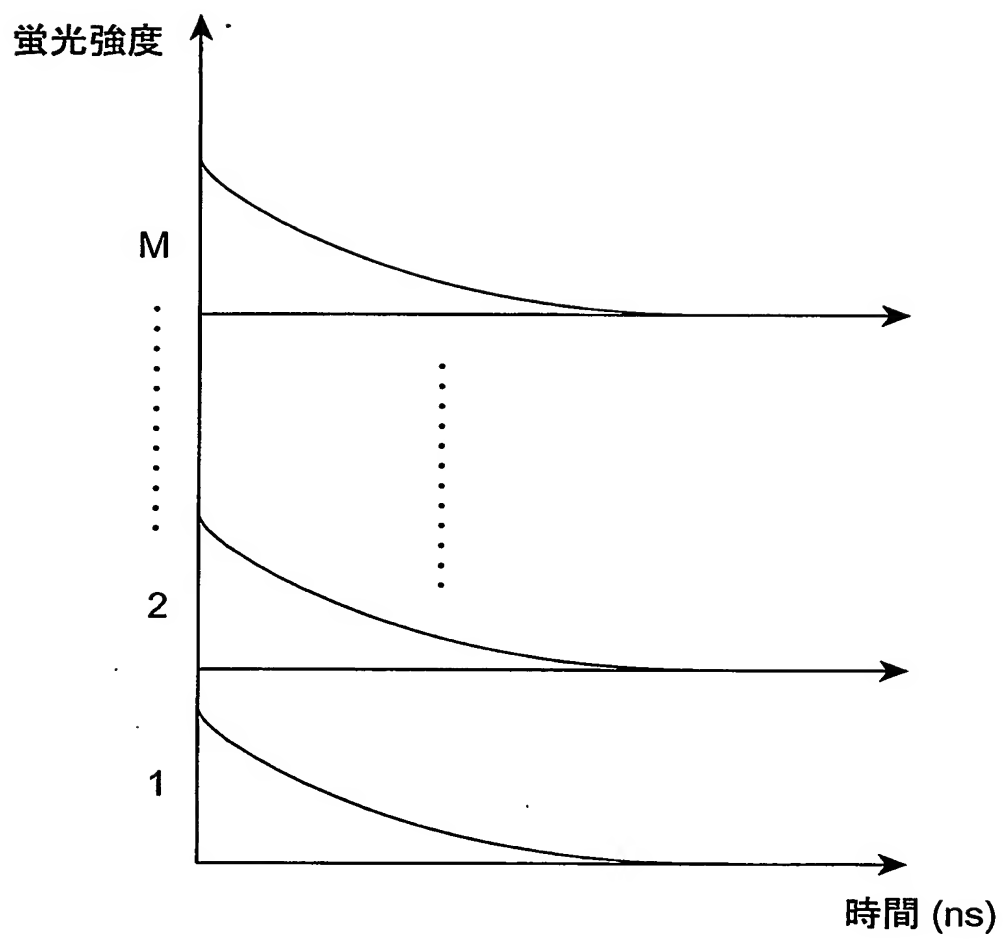
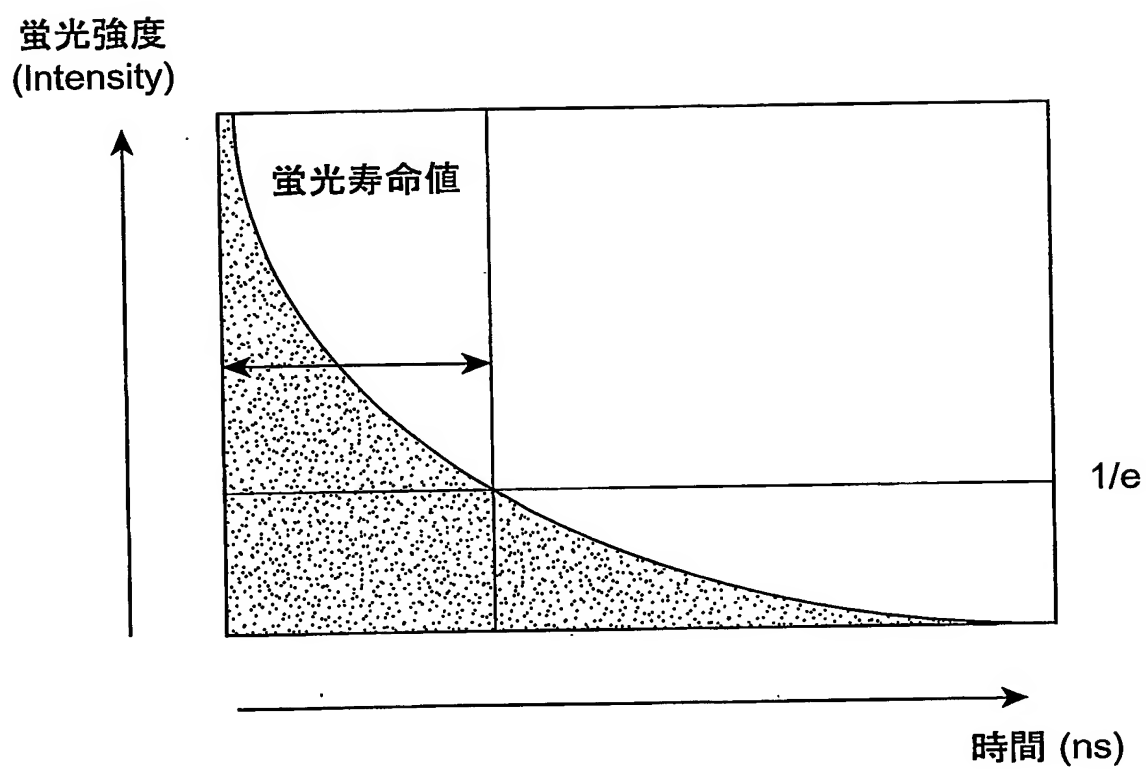
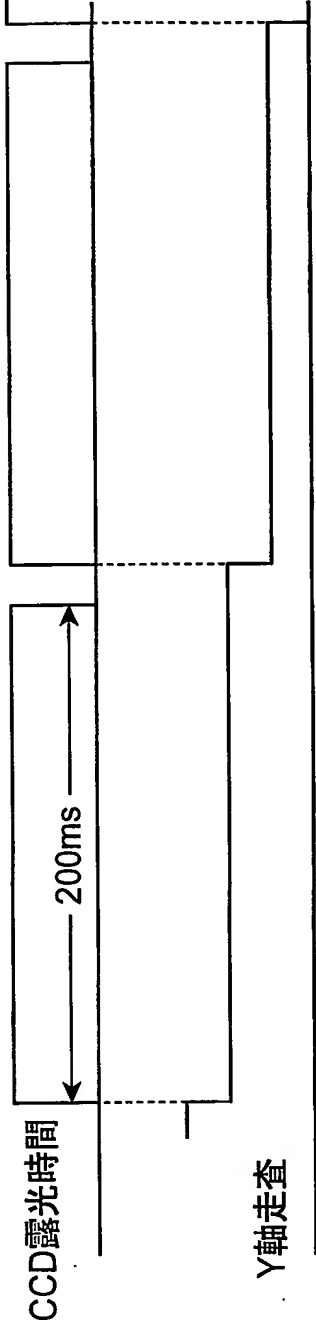
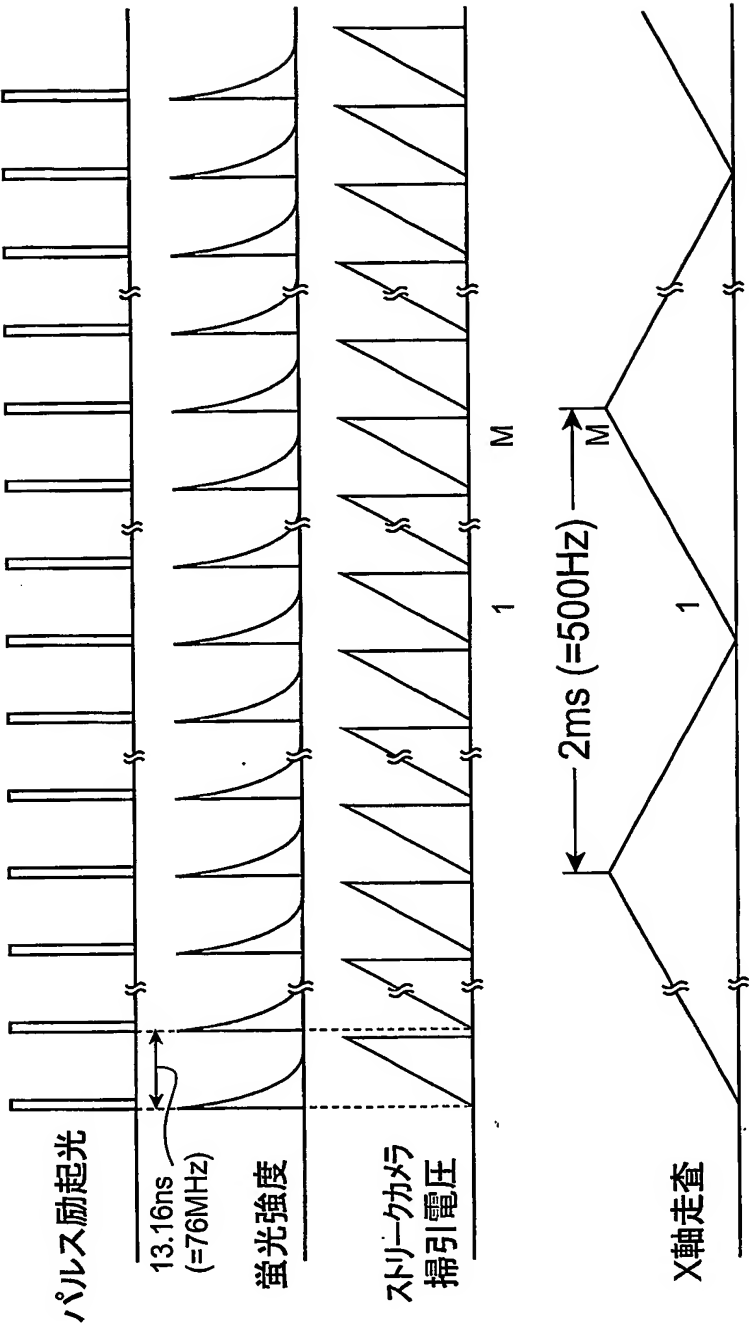


図5





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP03/06702

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N21/62-21/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/10727 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP.), 07 February, 2002 (07.02.02), Full text; Figs. 1 to 5 & JP 2002-39943 A 06 February, 2002 (06.02.02), Full text; Figs. 1 to 5	1-6
Y	J. Sytsma et al., Time-gated fluorescence lifetime imaging and microvolume spectroscopy using two-photon excitation, Journal of Microscopy, July 1998, Vol.191, pages 39 to 51	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
30 July, 2003 (30.07.03)

Date of mailing of the international search report
12 August, 2003 (12.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

PCT/JP03/06702

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2231958 A (Hmamaatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 28 November, 1990 (28.11.90), & JP 2-268254 A 01 November, 1990 (01.11.90), Full text; Figs. 1 to 16	1-6
Y	Federik Ossler et al., Two-dimensional visualization of fluorescence lifetimes by use of a picosecond laser and a streak camera, Applied Optics, Vol.37, No.12, 20 April, 1998 (20.04.98), pages 2303 to 2314	1-6
Y	JP 11-118716 A (Nikon Corp.), 30 April, 1999 (30.04.99), Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none)	4
Y	JP 2000-88751 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 31 March, 2000 (31.03.00), Full text; Figs. 1 to 4 (Family: none)	4
Y	JP 2001-356272 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 26 December, 2001 (26.12.01), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none)	5
A	JP 2001-194305 A (Laboratory of Molecular Biophotonics), 19 July, 2001 (19.07.01), Full text; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G 01 N 21/64

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G 01 N 21/62-21/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T ファイル (J O I S)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 02/10727 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) 2002.02.07, 全文, 第1-5図 & JP 2002-39943 A, 2002.02.06, 全文, 第1-5図	1-6
Y	J. Sytsma et al., Time-gated fluorescence lifetime imaging and microvolume spectroscopy using two-photon excitation, Journal of Microscopy, July 1998, Vol. 191, p. 39-51	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.07.03

国際調査報告の発送日

12.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 佳規



2W

3009

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	GB 2231958 A (Hmamaatsu Photonics Kabushiki Kaisha) 1990. 1 1. 28, 第1-24図 & JP 2-268254 A, 1990. 11. 01, 全 文, 第1-16図	1-6
Y	Federik Ossler et al., Two-dimensional visualization of fluorescence lifetimes by use of a picosecond laser and a streak camera, Applied Optics, Vol.37, No.1 2, 20 April 1998, p.2303-2314	1-6
Y	JP 11-118716 A (株式会社ニコン) 1999. 04. 30, 全文, 第1 -4図 (ファミリーなし)	4
Y	JP 2000-88751 A (オリンパス光学工業株式会社) 2000. 03. 3 1, 全文, 第1-4図 (ファミリーなし)	4
Y	JP 2001-356272 A (オリンパス光学工業株式会社) 2001. 12. 26, 全文, 第1-5図 (ファミリーなし)	5
A	JP 2001-194305 A (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 200 1. 07. 19, 全文, 第1-3図 (ファミリーなし)	1-6